

Mineral dust induced pneumoconiosis: a pivotal role for the inflammasome

Citation for published version (APA):

Peeters, P. M. (2015). *Mineral dust induced pneumoconiosis: a pivotal role for the inflammasome*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20150529pp>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150529pp](https://doi.org/10.26481/dis.20150529pp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 10

SUMMARY/SAMENVATTING

SUMMARY

The aim in the first part of this thesis was to provide more insight into the pathobiology of occupational lung diseases by investigating how exposure to different crystalline and amorphous mineral particles and fibers can give rise to several changes in gene expression patterns in bronchial epithelial cells.

Already in the 16th century it was described that exposure to mineral particles is associated with pulmonary disorders including fibrotic lung diseases. Pneumoconiosis refers to a group of non- neoplastic lung diseases that result from the inhalation of organic and non-organic particles which are unable to be removed by the natural defense mechanisms in the lung tissue. Asbestosis and silicosis are the two most studied diseases associated with the accidental or occupational inhalation of different silica polymorphs.

In **Chapter 2** of this thesis, we provide a literature study that bundles both physicochemical aspects and molecular mechanisms and experimental pathology within environmental toxicology and more specifically in the context of asbestosis and silicosis. In **Chapter 3**, an example is given of how gene expression analysis in an *in vitro* model can provide a prediction for the acute response of lung epithelial cells, the first cells that come in contact with asbestos fibers or silica particles. In addition, these reactions could be linked to bio-functional signal transduction cascades that can lead to specific forms of these lung diseases. Accordingly, many of these changes can be linked to clinical biomarkers in patient samples exposed to asbestos fibers or silica particles. In summary, our data indicate early changes in both common gene expression, which can be coupled to both pathogenic fibrosis caused by minerals, as well as unique gene expression changes by silica that promote connective tissue formation, and by asbestos which are inherent in the development of lung cancer and mesothelioma. Our analysis identified new target molecules which could contribute to innovations in the diagnosis and therapy of fibroproliferative diseases and cancer. Furthermore, in **Chapter 4**, we demonstrate that surface characteristics of crystalline silica are decisive for the acute response of lung epithelial cells. As a result, this *in vitro* model is an alternative tool instead of expensive and time-consuming *in vivo* toxicological animal studies in order to study the potential adverse effects of environmental particles.

For the second part of this thesis we investigated the response to exposure to harmful particles and fibers in epithelial cells of the lungs, with a focus on the inflammatory responses and the mucosal immunity. Given our findings in *in vitro* studies and the emerging role of the danger-detecting multi-protein, called the inflammasome, this molecule was the main focus of research in this section.

In **Chapter 5** we demonstrated, based on a review about inflammasome expression, a present variable set of inflammasome subtypes in epithelial cells of different organs, possibly working cooperatively to strengthen the immune response and distinguish themselves with respect to the release of several mediators. As a result, it appears that inflammasome activation and subsequent release of "alarming" proteins is not limited to macrophages, indicating that epithelial cells can be considered as important cells of the immune system.

With regard to the lungs, the inflammasome hitherto was mainly described in cells of the myeloid compartment. The presence and functional activation of the NLRP3 inflammasome in lung epithelial cells was therefore examined in **Chapter 6**. It was proved that cristobalite

silica in human lung epithelial cells *in vitro* increases the processing and secretion of inflammatory and alarmin proteins in bronchial epithelial cells. Further, we demonstrated that the release of these proteins, such as interleukin-1 β , is regulated by the NLRP3 inflammasome and that secretion of bFGF and HMGB1 is dependent on silica particle uptake. An important observation was that fibroblast proliferation is affected by exposure to bronchial epithelial cell conditioned medium, which indicates a complex crosstalk between the various cell types described above and a possible role for the inflammasome in the development of lung fibrosis.

Subsequently in **Chapter 7**, it was confirmed that inflammasome activation also occurs after exposure to crystalline polymorphs. If the surface reactivity of these particles was modified, the release of NLRP3-associated inflammatory and fibrotic mediators and alarm signals from both lung epithelial cells and differentiated macrophages was affected. Further, thioredoxin had the potential to modulate silica-induced caspase-1 activity in both cell types. In the last part of this chapter, inflammasome activation was measured by means of the detection of caspase-1 cleavage products in the lavage fluid of quartz exposed rats at different time points. This pointed towards persistent inflammasome activation in different cellular and interstitial compartments of the rat lung, which could be reduced by surface modification of the quartz particles.

Using immunohistochemical experiments with human autopsy samples, it was possible in **Chapter 8** to integrate the results of basic fundamental research and extrapolating them into clinical research. Here, we demonstrated semiquantitatively increased caspase-1 and interleukin-1 β expression levels in multiple predetermined cellular compartments of the lung tissue of miners that have silicosis versus miners without silicosis. Moreover, the fact that both groups were exposed to similar amounts of dust suggests that exposure is not the only root of inflammasome activation. In addition to a possible role for inflammasome activation in silicosis development of miners, this study demonstrated the involvement of different cellular compartments in the development of the disease.

In summary, the studies described in this manuscript reveal possible alternative ways to diagnose interstitial lung diseases. As we were also able to show a significant role for inflammasome activation in lung epithelial cells and consequently on fibroblasts, two major cell types involved in the underlying inflammation and fibrotic aspects of silicosis, this multiprotein could be a very interesting therapeutic target. Especially since the possible extrapolation of the data into human experiments, the clinical relevance of these findings is increased. Our review regarding inflammasome expression and functional activation in multiple epithelial barriers of different organs further underlines the importance of continued research which in turn can create possible routes for innovations in the therapeutic field of a variety of inflammatory diseases. Overall, this research may thus give rise to the possible development of new diagnostic and therapeutic agents to monitor and combat the effects of the dust exposure.

SAMENVATTING

Sinds de 16^{de} eeuw werd beschreven dat blootstelling aan minerale deeltjes geassocieerd is met longstoornissen waaronder fibrotische longziekten. Pneumoconiosis refereert naar een groep niet-neoplastische longziekten die ontstaan door het inhaleren van organische en niet-organische deeltjes die niet verwijderd kunnen worden door het natuurlijke afweersysteem in het longweefsel. Asbestose en silicose zijn de twee meest bestudeerde longaandoeningen veroorzaakt door het inhaleren van verschillende silica polymorfen. Dit werd in hoofdstuk 1 beschreven als algemene inleiding.

De doelstelling van dit proefschrift is meer inzicht krijgen in de pathogenese van silicosis and asbestosis. In het **eerste deel** van dit proefschrift hebben we bestudeerd hoe blootstelling aan verschillende kristallijne en amorf minerale deeltjes alsook vezels aanleiding kan geven tot diverse veranderingen in genexpressie patronen in bronchiale epitheliale cellen, en hierdoor meer inzicht te krijgen in de pathobiologie van interstitiële longaandoeningen.

Hoofdstuk 2 omvat een literatuurstudie die zowel de fysico-chemische aspecten als de moleculaire mechanismen en de experimentele pathologie binnen de omgevings toxicologie beschrijft, met focus op asbestose en silicose. Tot nu toe bestaan er geen effectieve behandeling voor het genezen van beide ziektebeelden die een uiteenlopende histopathologisch beeld hebben. Omdat asbestose en silicose zo distincte histologische karakteristieken vertonen werd in **hoofdstuk 3**, in een *in vitro* model, een voorbeeld gegeven hoe genexpressie analyse een predictie kan verschaffen wat betreft de acute reactie van long epitheel cellen, die als eerste in contact komen met asbest vezels of silica deeltjes. Bovendien konden deze reacties gelinkt worden aan biofunctionele signaaltransductie cascades die geassocieerd zijn met specifieke vormen van deze longziekten. Veel van deze veranderingen kunnen worden gekoppeld aan biomarkers in klinische patiënten materiaal blootgesteld aan asbestvezels of silica deeltjes. Kortom, onze data geven vroege veranderingen aan in zowel de gemeenschappelijke genexpressie, die kan worden gekoppeld aan fibrose veroorzaakt door beide pathogene mineralen, alsook aan unieke genexpressie veranderingen door silica die bindweefselvorming bevorderen en door asbest die inherent zijn aan de ontwikkeling van longkanker en mesotheliom. Onze analyses brachten ook vele nieuwe moleculen aan het licht die in functionele studies kunnen worden getest als mogelijk doelwit wat zou kunnen bijdragen aan innovatie in detectie en therapie van fibroproliferatieve ziekten en kanker. Verder werd in **hoofdstuk 4** onderbouwd op basis van de vergelijking met amorf silica dat de oppervlakte karakteristieken van kristallijn silica bepalend zijn voor de acute reactie van longepitheelcellen. Hierdoor is er met dit *in vitro* model een alternatieve methode voor handen ten opzichte van duurdere en tijdrovende *in vivo* toxicologische dierstudies om mogelijke predicties te doen wat betreft de potentiële schadelijke effecten van omgevingsdeeltjes.

Het **tweede deel** van dit proefschrift had het doel om een beter begrip te krijgen wat betreft ontstekingsreacties en mucosale immuun reacties die ontstaan als reactie op schadelijke deeltjes in long epitheel cellen. Gezien bevindingen in onze genexpressie studies en vanwege de opkomende rol van het gevaar detecterend multiproteïne, het inflammasoom genaamd,

werd dit complex in het tweede deel van het proefschrift de belangrijkste focus van het onderzoek.

In **hoofdstuk 5** werd door middel van een overzicht van inflammasoom expressie in epitheliale cellen van verschillende organen een set aan inflammasoom subtypes benoemd, die mogelijk coöperatief de immuun respons kunnen versterken en zich onderscheiden in de vrijstelling van verschillende mediators. Hiermee tonen we aan dat inflammasoom activatie en daaropvolgende vrijzetting van “alarmerende” eiwitten niet beperkt is tot macrofagen en dat epitheelcellen beschouwd kunnen worden als zeer belangrijke cellen van het immuunsysteem.

Een belangrijke rol voor het inflammasoom in silicose werd eerder aangetoond, maar dit gaat voornamelijk uit van een rol in professionele immuuncellen. In **hoofdstuk 6** was de aanwezigheid en functionele activering van het NLRP3 inflammasoom door cristobaliet silica in humane long epitheelcellen *in vitro* onderzocht. Er werd bewezen dat silica de verwerking en secretie vergroot van ontstekings- en alarm eiwitten in bronchiale epitheelcellen. Verdere aanwijzingen dat vrijzetting van deze eiwitten, zoals interleukin-1beta, wordt gereguleerd door het NLRP3 inflammasoom en dat de secretie van bFGF en HMGB1 afhankelijk is van de opname van de silica deeltjes. Een belangrijke observatie was ook dat fibroblast proliferatie beïnvloed wordt door blootstelling aan bronchiale epitheliale cellen geconditioneerd medium wat duidt op een belangrijke communicatie tussen de verschillende celtypen hierboven beschreven en een mogelijke rol voor het inflammasoom in de ontwikkeling van longfibrose.

Aansluitend hierop en met de kennis van **hoofdstuk 4** waarin we het belang van oppervlakte eigenschappen van silica deeltjes aantoonden, werd in **hoofdstuk 7** bewezen dat deze inflammasoom activatie ook optreedt na blootstelling aan kristallijne polymorfen en dat de oppervlakte reactiviteit van deze deeltjes de vrijzetting van NLRP3-geassocieerde inflammatoire en fibrotische mediators en alarmsignalen van zowel longepitheelcellen als gedifferentieerde macrofagen kon beïnvloeden. Verder kon het antioxidant eiwit thioredoxine de silica-geïnduceerde caspase-1 activiteit in beide celtypen dempen. Bovendien werd in dit hoofdstuk inflammasoom activatie, aan de hand van de detectie van gekleefde caspase-1 producten in lavage vocht van silica blootgestelde ratten gestaafd op verschillende tijdstippen na blootstelling aan kwarts. Hierbij toonden we met immunohistochemie aanhoudende inflammasoom activering, die wordt verminderd door oppervlaktemodificatie van de kwartsdeeltjes, aan in verschillende cellulaire en interstitiële compartimenten van de rat long.

Met behulp van immunohistochemische experimenten op humaan autopsie materiaal was het in **hoofdstuk 8** mogelijk om de resultaten van het hoger beschreven fundamenteel onderzoek te extrapoleren naar de kliniek. Hier laten we verhoogde expressie niveaus zien van caspase-1 en interleukine-1 β in meerdere cellulaire compartimenten van het longweefsel van mijnwerkers met silicose in vergelijking tot mijnwerkers zonder silicose. Daarenboven is de blootstelling gelijk tussen beide groepen en kan dus gezegd worden dat blootstelling alleen niet aan de basis ligt van inflammasoom activatie. Naast een mogelijke rol voor inflammasoom activatie in silicose ontwikkeling van mijnwerkers, toonde deze studie de betrokkenheid aan van verschillende cellulaire compartimenten in de ontwikkeling van de ziekte.

Samengevat beschrijven de studies uitgevoerd in dit proefschrift een mogelijk alternatief voor de diagnose van interstitiele aandoeningen. Aangezien we in staat waren om een belangrijke rol toe te schrijven aan inflammasoom activatie in epitheelcellen en vervolgens een interessant effect zagen op fibroblasten, twee belangrijke celtypen betrokken bij de onderliggende ontsteking en fibrotische kenmerken van silicose, kan dit multiproteïne een aanmerkelijk therapeutisch doelwit zijn. In het bijzonder door de extrapolatie van onze data in humane experimenten, is de klinische relevantie van deze bevindingen en dus de aandacht tot focus op dit therapeutisch doelwit molecule nog sterker toegenomen. Het belang van de inflammasoom in de epitheliale barrières van verschillende organen geeft aanleiding tot verder onderzoek en mogelijke routes voor innovaties in het therapeutische gebied van diverse ontstekingsziekten. Kortom, dit onderzoek kan derhalve leiden tot de mogelijke ontwikkeling van nieuwe diagnostische en therapeutische middelen tegen de effecten van de stofblootstelling.

